

Trabalho de Conclusão de Curso

**Expressão imuno-histoquímica das enzimas DNMT1, DNMT3a e
DNMT3b em queilites actínicas e carcinomas epidermóides labiais**

Soraia Rosa Alves



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Soraia Rosa Alves

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS DNMT1, DNMT3a E
DNMT3b EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
LABIAIS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel

Florianópolis
2015

Soraia Rosa Alves

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS DNMT1, DNMT3a E
DNMT3b EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
LABIAIS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de maio de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Cirurgiã Dentista Emanuely da Silva Chrun
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Cirurgiã Dentista Jussara Maria Gonçalves
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a Deus, meus pais,
familiares, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, minha saúde, minha família, meus amigos e permitir que eu tenha chegado até aqui.

Aos meus pais, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, incentivo, amor, carinho, por terem me proporcionado esse momento tão importante e me passado valores tão importantes que me tornaram a pessoa que sou hoje.

A minha irmã, minha sobrinha, meu cunhado, minha vó, por estarem sempre do meu lado me incentivando e me apoiando.

Ao meu namorado, por ter estado todos esses anos ao meu lado, me incentivado, ajudado, sempre acreditando e me motivando, com certeza essa vitória é sua também.

A minha dupla Fillipe, por ter convivido todos esses anos do meu lado, sempre me apoiando e ajudando, obrigada pela paciência, amizade, companheirismo, pelas tardes de estudo na biblioteca, pelas risadas e por toda a ajuda na clínica. Com certeza você fez toda a diferença na minha vida acadêmica e me ajudou para que eu chegasse até aqui.

As minhas amigas de sala Rafaela, Larissa e Jamile por terem feito meus dias melhores e sempre estado ao meu lado. A minha melhor amiga da faculdade Fernanda, pelo companheirismo, amizade e sinceridade. A minha amiga Ana Maria, com quem dividi apartamento todos esses anos, pela convivência e amizade, e a todos os meus outros amigos, principalmente aqueles que trabalharam comigo no laboratório, como a Kamile e Bianca, cada um de sua forma faz parte dessa conquista.

A esta Universidade, na qual confio e me orgulho muito, por seu corpo docente e discente, pela oportunidade desses cinco anos de muito aprendizado. Agradeço muito a cada professor que nesses anos passaram conhecimento e se dedicaram para a nossa formação.

Ao meu orientador Dr. Filipe Modolo Siqueira, que teve um papel fundamental na concretização deste trabalho, ensinando-me a fazer pesquisa com qualidade e seriedade. Agradeço pelo convite para ser sua aluna de PIBIC esses 3 anos de nosso projeto, por ter aceitado me orientar, por todo o comprometimento e dedicação com esta pesquisa. Agradeço também por todos os ensinamentos passados, pela disponibilidade dos materiais, pela disponibilidade de tempo para me ensinar, pela sabedoria, paciência e pela compreensão durante as minhas limitações. Foi muito gratificante ser sua orientada, sou muito grata pelo carinho, amizade, confiança, por tudo que fez por mim e por esse trabalho. Muito obrigada

por ter me incentivado a pesquisa, ampliado meus conhecimentos e ter me mostrado o outro lado da odontologia que poucos conhecem.

Ao meu co-orientador Dr. Filipe Ivan Daniel, exemplo de profissional e pessoa, extremamente dedicado e competente, sempre presente neste trabalho, disposto a ajudar e tirar dúvidas, obrigada pela ajuda, confiança, conhecimento passado e pela oportunidade de participar desse trabalho.

A professora Dr^a. Alessandra Camargo, por ter aceito fazer parte da minha banca, uma professora a qual sempre admirei não só pela excelente profissional, mas também por ser tão humana e atenciosa com os pacientes, sendo que nesse último semestre tive o prazer de conviver mais com ela, obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas amigas, pela oportunidade de estágio e pelo seu carinho, lhe admiro muito.

A mestranda Emanuely, por aceitar fazer parte da minha banca, pessoa da qual tive a oportunidade de conhecer e trabalhar no laboratório, uma pessoa incrível, responsável, atenciosa e de um caráter admirável.

A mestranda Jussara por ter aceito gentilmente ser da minha banca.

Aos funcionários do CCS: Rosângela, Nilcéia, Daiana, Iara, Luiz, Batista, muito obrigada por toda a ajuda nas clínicas, laboratórios e secretaria, com certeza com vocês tudo se tornou mais fácil e prazeroso.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“A invasão neoplásica é um processo dinâmico, complexo e com várias etapas.”

(LIN *et al.*, 2006)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar o papel das enzimas DNA metil transferases 1, 3a e 3b (sendo a DNMT1 responsável por manter o padrão de metilação após cada ciclo de replicação do DNA e a DNMT3a e 3b estão envolvidas na adição de grupos metil ao DNA que não tenha sido previamente metilado) no comportamento biológico da queilite actínica (lesão potencialmente malignizável), carcinoma epidermóide de lábio (lesão maligna) e da mucoccele (lesão não neoplásica), por meio da reação de imuno-histoquímica. Assim, trinta casos de queilite actínica (QA), trinta casos de carcinoma epidermóide de lábio (CEL) e vinte casos de mucoccele (MUC) foram selecionados a partir de arquivos do Laboratório de Patologia Bucal e do Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Santa Catarina e submetidos à reação de imuno-histoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase para a avaliação das enzimas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A avaliação da imunorreatividade foi realizada por 1 examinador, avaliando os núcleos e citoplasmas negativos e positivos e os resultados submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Apresentando como resultados: DNMT1 maior imunorreatividade nuclear nos casos de CEL (68,6% \pm 29,5%), quando comparado com a MUC (47,0% \pm 33,3%); DNMT3a mostrou maior imunorreatividade nuclear e citoplasmática nos casos de QA (35,9% \pm 31,3%) comparados a MUC (4,4% \pm 5,2%) e CEL (8,8% \pm 22,9%); DNMT3b apresentou maior imunorreatividade nuclear nos casos de CEL (70,9% \pm 29,4%) quando comparados a MUC (37,9% \pm 34,2%) e QA (44,0% \pm 29,0%). Com os resultados observa-se que o aumento da expressão destas enzimas pode estar relacionado com a carcinogênese labial induzida pela radiação solar, seja na sua fase pré-maligna de QA (DNMT1 e DNMT3a) ou no CEL já instalado (DNMT1 e DNMT3b).

Palavras-chave: Metilação de DNA, Queilite, Carcinoma.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the role of DNA methyl transferase enzymes 1, 3a and 3b (the DNMT1 is responsible for maintaining the methylation pattern after each DNA replication cycle and DNMT3a and 3b are involved in the addition of methyl groups to DNA which has not been previously methylated) in the biological behavior of actinic cheilitis (pre-malignant lesion), squamous cell carcinoma of the lip (malignant lesion) and mucocele (non-neoplastic lesion), by immunohistochemical reaction. Thus, thirty cases of actinic cheilitis (QA), thirty cases of squamous cell carcinoma of the lip (CEL) and twenty cases of mucocele (MUC) were selected from files of the Oral Pathology Laboratory and Pathology Service of the Federal University of Santa Catarina and submitted to immunohistochemical reaction by the method streptavidin-biotin-peroxidase for the evaluation of the enzymes DNMT1, DNMT3B and DNMT3a. The evaluation of immunoreactivity was performed by one investigator, assessing the positive and negative nuclei and cytoplasm, and the results submitted to the Kruskal-Wallis test. Introducing the following results: DNMT1 showed higher nuclear immunoreactivity in CEL cases ($68.6\% \pm 29.5\%$) compared to MUC ($47.0\% \pm 33.3\%$); DNMT3a showed higher nuclear and cytoplasmic immunoreactivity in QA ($35.9\% \pm 31.3\%$) compared to MUC ($4.4\% \pm 5.2\%$) and CEL ($8.8\% \pm 22.9\%$); DNMT3b presented the higher nuclear immunoreactivity in CEL cases ($70.9\% \pm 29.4\%$) when compared to MUC ($37.9\% \pm 34.2\%$) and QA ($44.0\% \pm 29.0\%$). The increased expression of these enzymes may be related to lip carcinogenesis induced by solar radiation, either in its premalignant phase QA (DNMT1 and DNMT3a) or already installed CEL (DNMT1 and DNMT3B).

Keywords: DNA Methylation, Cheilitis, Carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão imuno-histoquímica das DNMTs.....	46
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos anticorpos para as DNMTs.....	36
Tabela 2 – Intensidade da imunomarcac�o para as DNMTs.....	40
Tabela 3 – Porcentagem da imunomarcac�o para as DNMTs	41
Tabela 4 – Porcentagem da imunomarcac�o de acordo com o grau de displasia dos QAs	41
Tabela 5 – Porcentagem da imunomarcac�o para as DNMTs de acordo com a grada�o histopatol�gica nos casos de CEL	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE – Carcinoma epidermóide;
CEL – Carcinoma Epidermóide Labial;
UV – Radiação Ultravioleta;
QA – Queilite Actínica;
MUC – Mucoccele;
LPB/UFSC – Laboratório de Patologia Bucal – UFSC;
PBS – *Phosphate-buffered saline*;
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;
HE – Hematoxilina e Eosina;
DNMT – DNA metil transferase;
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
SAP HU/UFSC – Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC

LISTA DE SÍMBOLOS

μm - micrometro.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivo específico.....	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Delineamento do estudo.....	35
3.2	Aspectos Éticos.....	35
3.3	Seleção do material de estudo.....	35
3.4	Imuno-histoquímica.....	35
3.5	Avaliação da Imunorreatividade.....	37
3.6	Análise dos dados.....	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	DNMT1.....	42
4.2	DNMT3a.....	43
4.3	DNMT3b.....	44
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEPISH.....	59

1 INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) ou queilite solar é uma doença considerada potencialmente malignizável, ou seja, doença com risco eminente de crescimento celular descontrolado e transformação em neoplasia maligna – mais especificamente o carcinoma epidermóide de lábio (CEL) - que acomete a semimucosa (vermelhão) labial inferior e resulta de exposição crônica e prolongada à radiação ultravioleta (UV) (MARTÍNEZ, BRETHAUER *et al.*, 2005; CURY, FURUSE *et al.*, 2007). A QA acomete normalmente pacientes do gênero masculino, etnia leucoderma, em faixa etária entre sexta a sétima décadas de vida e caracteriza-se por alterações clinicamente detectáveis como atrofia e ressecamento da semimucosa labial, escurecimento ou perda de nitidez da linha mucocutânea, descamação constante e até a formação de áreas ulceradas (MARKOPOULOS, ALBANIDOU-FARMAKI E KAYAVIS, 2004).

É sabido que a exposição à radiação ultravioleta (UV) pode levar a alterações genótípicas e fenótípicas nas células epiteliais, algumas consideradas alterações pré-malignas e genericamente chamadas de atipias ou displasias epiteliais (OUHTIT, MULLER *et al.*, 2000). Sabe-se que tais displasias epiteliais estão associadas a um aumento de 10% a 20% do risco para desenvolvimento de CE a partir de lesões potencialmente malignizáveis (DOS SANTOS, DE SOUSA *et al.*, 2003).

O CE corresponde a 90% a 95% dos casos de neoplasias malignas da boca (TEIXEIRA, ALMEIDA *et al.*, 2009). Excluindo-se o câncer de pele, o CE bucal pode ser considerado o câncer mais comum da região de cabeça e pescoço (DAHER, PEREIRA *et al.*, 2008). No Brasil, a incidência do CE bucal é uma das mais altas do mundo (DEDIVITIS, FRANÇA *et al.*, 2004). O Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer, por meio da publicação Estimativa 2014, estimou a ocorrência de 15.290 casos novos de câncer na cavidade oral, sendo 11.280 casos novos em homens e 4.010 em mulheres (BRASIL, 2014).

Entre os CE, aqueles localizados no lábio (CEL) configuram uma doença de grande importância no Brasil, um país tropical que possui elevada incidência de radiação ultravioleta (UV) (SENA, COSTA *et al.*, 2010) e onde a população sofre constante exposição solar tanto na área rural, quanto em áreas urbanas, devido principalmente à sua ocupação profissional (PRADO E PASSARELLI, 2009). Segundo Kornevs *et al.* (2005) o CEL corresponde a 30% das neoplasias malignas da boca nas regiões tropicais, inicia-se como um processo crônico

causado pela exposição contínua à luz solar (radiação UV) e normalmente é precedido de uma QA (BERNER, JEUNON *et al.*, 2007). As características clínicas do CEL são variáveis, dependendo do estágio em que a lesão se encontra. As lesões iniciais aparecem sob a forma de uma úlcera crônica que não cicatriza, ou como uma lesão exofítica, que, ocasionalmente possui uma natureza verrucosa (REGEZI, SCIUBBA *et al.*, 2008).

A oncogênese ou desenvolvimento das neoplasias malignas em geral, envolve basicamente o acúmulo de mutações gênicas com perda do controle do crescimento celular (PARISE, 2000). Duas classes de genes que sofrem mutações estão envolvidas no câncer: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (LODISH, BERK *et al.*, 2005). Os proto-oncogenes estão diretamente relacionados com o controle do crescimento celular e, quando alterados por mutações, translocações e amplificações, são chamados de oncogenes, pois promovem o crescimento celular independente de qualquer controle (CONTRAN, KUMAR *et al.*, 1991; PARISE, 2000). Um oncogene codifica uma proteína (oncoproteína) que pode diferir ou não da proteína normal codificada pelo proto-oncogenes correspondente. Neste último caso o efeito oncogênico é resultado da produção de níveis acima do normal, ou da expressão dessa proteína em células onde não seria produzida normalmente (LODISH, BERK *et al.*, 2005).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que de alguma forma impedem ou reduzem a proliferação celular. A sua inativação contribui para o crescimento celular desregulado, por resultar em uma diminuição nas proteínas inibidoras do crescimento (PARISE, 2000; LODISH, BERK *et al.*, 2005; MEHROTRA E YADAV, 2006). Há cinco grandes classes de proteínas expressas por genes supressores tumorais: proteínas intracelulares que regulam ou inibem a progressão para um estágio específico do ciclo celular; receptores ou transdutores de sinais que inibem a proliferação celular; proteínas de verificação (pontos de controle) que travam o ciclo celular caso haja anormalidade cromossômica; proteínas que promovem a apoptose e enzimas que participam do reparo do DNA (LODISH, BERK *et al.*, 2005).

No entanto, a oncogênese não é resultado somente do mecanismo de mutação gênica, mas também de alterações epigenéticas. As alterações epigenéticas são aquelas que modificam os padrões de expressão gênica sem afetar a sequência do DNA primário. Envolvem tanto a perda quanto o ganho de metilação de DNA, bem como modificações das histonas. Estas alterações podem iniciar a proliferação das células durante os estágios iniciais da transformação maligna. A hipermetilação de genes resulta no seu silenciamento enquanto a

hipometilação resulta no aumento da sua transcrição. Após a metilação, o produto do gene não é produzido, embora a sequência do DNA seja mantida (EGGER, LIANG *et al.*, 2004; BAYLIN E OHM, 2006; HA E CALIFANO, 2006).

A metilação do DNA é uma modificação química covalente, que resulta da adição de um grupo metil (CH₃) no carbono 5 do anel citosina, reação esta que interfere na organização da cromatina e na expressão do gene (MIRANDA E JONES, 2007; JONES E LIANG, 2009). Essa modificação ocorre nas ilhas CpG, que são sítios do DNA ricos em nucleotídeos CG (Citosina e Guanina), localizados dentro de regiões promotoras de quase metade de todos os genes dos mamíferos, que geralmente não estão metiladas. A metilação dessas regiões está associada com perda de função do gene, por meio da inativação da transcrição, o que pode promover uma vantagem às células neoplásicas (JONES E BAYLIN, 2002; EGGER, LIANG *et al.*, 2004). Estas modificações têm sido encontradas durante os estágios iniciais da oncogênese (EGGER, LIANG *et al.*, 2004; ZHU, HUANG *et al.*, 2007).

Esse processo é realizado por 3 enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT): DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (BAYLIN, 2002; JONES E BAYLIN, 2002; SAWADA, KANAI *et al.*, 2007). A primeira delas, DNMT1, é responsável por manter o padrão de metilação após cada ciclo de replicação do DNA, utilizando o padrão presente na fita-mãe. Após cada divisão celular, apenas uma das fitas de DNA possui radicais metil, que é a fita proveniente da célula-mãe. A enzima DNMT1, por sua vez, realizará a metilação da segunda fita, exatamente nas regiões em que o radical metil encontra-se na fita-mãe. Em células normais essa enzima é responsável pela manutenção do padrão preciso de metilação durante a mitose. As DNMT3a e DNMT3b estão envolvidas na adição de grupos metil ao DNA que não tenha sido previamente metilado, processo denominado de metilação *de novo* (BIRD, 1999; ZHU, HUANG *et al.*, 2007).

De acordo com Zhu *et al.*, 2007, a sobre-expressão da DNMT1 leva a um padrão de metilação descontrolado no genoma e em muitos genes supressores de tumor. O papel da metilação do DNA e a expressão das enzimas DNMTs têm sido estudados tanto em tecidos neoplásicos quanto nas lesões precursoras de câncer em diversos órgãos.

Robertson *et al.* (1999) investigaram o padrão de expressão de RNAm de DNMT1, DNMT3a e DNMT3b em tecidos neoplásicos de bexiga, cólon, rim e pâncreas, bem como em tecidos normais adjacentes a essas lesões. Como resultado verificaram significativa sobre-expressão de DNMT3b nas neoplasias, enquanto DNMT1 e DNMT3a foram apenas moderadamente sobre-expressas e com uma frequência menor (ROBERTSON *et al.*, 1999).

Ogi *et al.*(2002) detectaram a presença de genes metilados em 67 de 96 casos (70%) de carcinoma epidermóide (CE). Os achados indicaram, ainda, que não apenas um, mas múltiplos genes estavam aberrantemente metilados e que tal alteração poderia ser um útil marcador molecular para prever o prognóstico dos pacientes (OGI *et al.*, 2002).

A expressão imuno-histoquímica das enzimas DNMT1 e DNMT3a foi investigada por Choi *et al.*(2003) em tecido hepático normal, nódulos cirróticos, nódulos hepáticos displásicos e em hepatocarcinomas iniciais e avançados de 59 pacientes. Os autores verificaram que 71,2% dos tecidos normais não apresentavam imunorreatividade nuclear para DNMT1. Em relação à DNMT3a, nenhuma imunorreatividade nuclear foi detectada nos casos de tecido normal ou com displasia leve. A positividade para ambas as enzimas foi progressivamente aumentando quando os tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos foram avaliados. Os dados sugerem que a expressão da DNMT1 e DNMT3a nuclear tem importante papel nos estágios precoces da hepatocarcinogênese (CHOI *et al.*, 2003).

Arai *et al.*(2006) analisaram a presença de metilação de múltiplas ilhas CpG em tecidos tumorais e perilesionais (histologicamente normais) de 94 pacientes com carcinoma renal e em amostras de tecido renal normal de 16 pacientes sem envolvimento renal. O acúmulo de metilação foi observado em tecidos perilesionais obtidos de pacientes com tumor renal, mas não nas amostras de tecido não neoplásico, indicando que a hipermetilação do DNA pode revelar tecidos que estejam em estágio pré-canceroso (ARAI *et al.*, 2006).

Sawada *et al.*(2007) examinaram, por imuno-histoquímica, a expressão de DNMT1 em 161 amostras de CE cervical e de lesões precursoras, de 49 pacientes. A imunorreatividade nuclear foi significativamente mais elevada nas neoplasias, quando comparada com o tecido histologicamente normal. A expressividade da enzima foi superior nas lesões precursoras classificadas como de alto grau e nos CE micro-invasivos, reduzindo nos carcinomas invasivos. Este resultado sugere que a sobre-expressão da DNMT1 foi um evento precoce da oncogênese. Além disso, os autores compararam os níveis de DNMT1 com o de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e não encontraram uma correlação, o que permite concluir que a sobre-expressão da enzima não resulta do número elevado de células em divisão durante a progressão da lesão (SAWADA *et al.*, 2007).

Zhu *et al.*(2007) estudaram a expressão imuno-histoquímica da DNMT1 em 48 pacientes com CE colo-retal, tanto no tecido tumoral, quanto no normal adjacente à lesão. A porcentagem de células mostrando positividade nuclear nos tumores (75,3%) foi significativamente maior do que no tecido normal (39%). Imunorreatividade superior foi

encontrada nos carcinomas, enquanto nenhuma ou fraca reatividade foi identificada na mucosa normal (ZHU *et al.*, 2007).

Nandakumar *et al.* (2011), por meio do estudo na exposição de ratos a radiação UVB, observaram maior taxa de metilação na pele irradiada em comparação com a pele não irradiada, comprovando que este tipo de radiação estimula a metilação do DNA nas células epiteliais da pele (NANDAKUMAR *et al.*, 2011).

Nosso grupo de trabalho investigou recentemente as DNMTs 1, 3a e 3b em CEs intrabuciais (lesão maligna) e leucoplasias bucais (lesão potencialmente malignizável), encontrando uma maior incidência da imunorreatividade nuclear para DNMT3a nos casos de CE bucal (39,9%), quando comparado ao epitélio normal (22,6%). Além disso, detectou-se uma significativa associação entre esta enzima e o uso de álcool e uma associação inversa entre DNMT1 e tabagismo (DANIEL, RIVERO *et al.*, 2010).

Tendo em vista a ausência de pesquisas que correlacionem a epigenética e a fotocarcinogênese em lábio e os poucos trabalhos que tratam da carcinogênese induzida pela radiação UV na pele, esse é o primeiro trabalho que teve como objetivo investigar o papel das DNMTs no processo de carcinogênese labial.

Desta forma, os pesquisadores pretenderam estudar o perfil imuno-histoquímico destas três enzimas em QAs (lesão potencialmente malignizável) e CELs (lesão maligna) em comparação com epitélio não neoplásico oriundo de fragmentos de mucocelo (MUC), pois um melhor entendimento das alterações moleculares que ocorrem nestas lesões durante os estágios de displasia epitelial e carcinoma invasivo pode aumentar as possibilidades de se detectar a progressão maligna a partir das lesões precursoras. O desenvolvimento de marcadores celulares para diferenciar as lesões que apresentem maior propensão para esta progressão poderá auxiliar o profissional na conduta frente a tais lesões (REIBEL, 2003; SILVERMAN, EVERSOLE *et al.*, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa foi estudar e comparar a expressão imuno-histoquímica das três enzimas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) em QAs, CELs e MUCs, bem como verificar se há relação entre a sua imunorreatividade com a agressividade.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) no núcleo e citoplasma das células epiteliais presentes nas QAs;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) no núcleo e citoplasma das células neoplásicas presentes nos CELs;
- Comparar a expressão imuno-histoquímica das DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) em MUCs, QAs e CELs;
- Relacionar a expressão imuno-histoquímica destas enzimas com a grau de displasias nas QA;
- Relacionar a expressão imuno-histoquímica destas enzimas com a gradação histológica dos CELs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Estudo observacional descritivo, retrospectivo.

3.2 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina sob protocolo 2274 (ANEXO A).

3.3 Seleção do material de estudo

As amostras de tecidos estudadas foram selecionadas no arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC) e Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário/UFSC (SAP HU-UFSC) oriundas de biópsias.

Foram selecionados 80 casos, por conveniência, casos diagnosticados como MUC, QA e CEL. As lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas simultaneamente por três examinadores para determinação da presença ou não de displasia epitelial nas QAs, bem como para determinação do grau de diferenciação histopatológica dos CELs, seguindo os critérios estabelecidos pela OMS utilizando microscópio multi-observador.

Amostras em que houveram discordância entre os examinadores quanto ao diagnóstico histopatológico ou que não foi possível a execução de todas as etapas referente à preparação histológica e à técnica de imuno-histoquímica foram excluídas do trabalho. O número de casos ao final do processo de seleção foi de: vinte casos de MUC, trinta de QAs e trinta de CELs.

3.4 Imuno-histoquímica

Os procedimentos para a realização da técnica de imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. Foi empregada a reação de imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase, para avaliação das proteínas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b.

Para cada antígeno foi obtido uma secção tecidual de 3 µm de espessura dos blocos de parafina. Tais secções foram distendidas em lâminas silanizadas e levados à estufa a 60°C por 1 hora e colocadas no xilol I *overnight*.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas no xilol II por 20 minutos e assim os cortes sofreram desparafinização em xilol e foram reidratados em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando pelo etanol absoluto (I, II e III), seguida pelo etanol 95% e etanol 85%. As lâminas posteriormente foram lavadas em água destilada por 10 minutos.

A peroxidase endógena foi bloqueada, no escuro, com peróxido de hidrogênio a 6% em metanol, por 20 minutos duas vezes. Seguido pela lavagem em PBS e água destilada. Para a recuperação dos sítios antigênicos (que eliminam as reações cruzadas entre as moléculas de formalina e proteína, caso contrário prejudicaria a interação entre antígeno-anticorpo e consequente a marcação imuno-histoquímica) foi realizado o tratamento das secções teciduais com tampão citrato 0,01M em banho-maria por 50 minutos a 96° C. Depois aguardou-se esfriar por 30 minutos, e deu-se 2 banhos de PBS, 5 minutos cada.

O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com leite em pó desnatado 5% em solução tampão *Phosphate-buffered saline* - PBS, à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguida de 2 lavagens com PBS de 5 minutos. Após, foi usada uma caneta hidrofóbica para a demarcação dos cortes.

A seguir os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-DNMT1 (IMG-261A, diluição 1:1500, Imgenex®, San Diego, EUA), anti-DNMT3a (IMG-268A, diluição 1:700, Imgenex®, San Diego, EUA) e anti-DNMT3b (IMG-184A, diluição 1:700, Imgenex®, San Diego, EUA), a 4°C, *overnight*.

Tabela 1 – Concentração dos anticorpos para DNMTs

Anticorpos	Concentração
DNMT1	1:1500
DNMT3a	1:700
DNMT3b	1:700

FONTE: Dados da pesquisa

Após o tempo de incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos a dois banhos de PBS e então incubados com o anticorpo secundário LSAB (DAKO, Carpinteria,

EUA), o primeiro frasco do kit LSAB utilizado possuía o anticorpo secundário anti-IgG deixado sobre o corte por 30 minutos, após 2 banhos de PBS de 5 minutos, em seguida foi utilizado o segundo frasco possuía streptavidina-biotina-peroxidase deixada por 30 minutos sobre o corte, ambas em temperatura ambiente. Após mais 2 banhos de 5 min de PBS. A revelação da reação ocorreu em incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) durante 2 minutos (esse valor foi padronizado em reações de testes anteriormente). Após lavagem em água destilada por 5 minutos, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, pelo tempo de dois minutos e novamente lavados em água corrente para a remoção do excesso do corante.

Após foi realizada a remoção do pigmento formólico com rápida imersão em solução aquosa de amônia 1% e lavado imediatamente em água corrente, durante 2 minutos. Assim, realizou-se a desidratação em álcool 85%, 95% e álcool etílico absoluto I, II e III cada um por 5 minutos. Por fim, foi realizada a diafanização por 20 minutos cada em xilol I e xilol II. Terminada a reação foi escolhida a lamínula adequada e colocado o entellan na lâmina que foi preservada na estufa por 24 horas para evitar a formação de bolhas.

Como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos da sequência da reação, em vez deles foi colocado somente o diluente de anticorpo. Espécimes de placenta foram utilizados em cada reação como controle positivo da imunorreatividade contra DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, conforme determinado previamente.

3.5 Avaliação da Imunorreatividade

As lâminas tiveram a sua identificação mascarada de forma que a captura das imagens e a análise da imunorreatividade foi realizada por um examinador cego. Foram capturados cinco campos equidistantes de cada lâmina, em aumento de 400x, envolvendo sempre a zona basal do epitélio, por meio de microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, USA), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens.

Para avaliação, foi empregado o software para análise de imagens digitalizadas *ImageJ* versão 1.41o (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Os núcleos e os citoplasmas corados em marrom (células positivas) e em azul (células negativas) foram contados por meio do software e a média de núcleos e citoplasmas positivos de cada caso foi calculada. Assim,

determinou-se a proporção das células positivas para cada amostra, expressa em porcentagem. Estes valores foram submetidos a uma análise estatística para comparação entre os grupos.

3.6 Análise dos dados

A comparação da imunopositividade nuclear e citoplasmática para cada DNMT entre cada grupo e a sua correlação com o grau de displasia epitelial nos casos de QA e diferenciação histopatológica dos CEL foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis. Considerou-se significantes valores de $p < 0,05$. Todos os dados coletados foram organizados em planilha eletrônica e posteriormente analisados no software SPSS® versão 11 (SPSS Inc., Headquarters, EUA).

4 RESULTADOS

Este projeto estudou a expressão imuno-histoquímica das enzimas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b no epitélio de 30 casos de QA, no epitélio neoplásico de 30 casos de CEL e no epitélio de 20 casos de MUC pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase. Os casos identificados como MUC foram compostos por fragmentos de mucosa oriunda de biópsias de mucocoele onde o epitélio de revestimento pavimentoso estratificado apresentava-se íntegro e relativamente livre de inflamação, sendo assim usada como o controle para comparação de um epitélio não-neoplásico. Os casos de QA exibiam revestimento epitelial ora acantótico, ora atrófico e com grau de displasia previamente determinado de acordo com os critérios da OMS, sendo classificados em: displasia leve (10 casos), displasia moderada (14 casos) e displasia severa (8 casos). A lâmina própria exibiu graus variados de degeneração basofílica do colágeno e inflamação. Os casos de CEL estudados foram compostos tanto por lesões em que o epitélio neoplásico ainda permanecia revestindo a mucosa, como por casos em que a úlcera estava consolidada e a maior parte do epitélio transformado encontrava-se disposto em ilhas e cordões que invadiam o tecido conjuntivo adjacente. O grau de diferenciação da lesão foi determinado de acordo com os critérios da OMS, classificando-os em bem diferenciado (12 casos), moderadamente diferenciados (8 casos) e pouco diferenciados (10 casos) (BARNES, 2005).

Em cada um dos casos, independentemente do diagnóstico, foram fotografados 5 campos equidistantes e contados os núcleos e citoplasmas positivos, além do total de células do campo, sendo os resultados apresentados na forma de “Média (\pm Desvio padrão)”. Além disso, foi feita a observação morfológica dessa marcação, que mostrou um padrão de divisão do epitélio em terço basal, terço médio e terço superior. No caso específico dos CELs, é importante ressaltar que o terço basal incluía as áreas de invasão nos casos em que o epitélio neoplásico ainda permanecia revestindo a mucosa e a zona periférica das ilhas e cordões de epitélio neoplásico naqueles casos em que a ulceração já havia acontecido. Os resultados estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 2 - Intensidade da imunomarcação para as DNMTs nas lesões estudadas

Enzima			MUC	QA	CEL
DNMT 1	Terço basal	Núcleo	+++	++/+++	-/+ / ++
		Citoplasma	+++	++/+++	++/+++
	Terço médio	Núcleo	+++	++/+++	++/+++
		Citoplasma	++/+/-	+/-	+/-
	Terço superior	Núcleo	+++	++/+++	++/+++
		Citoplasma	++/+/-	+/-	+/-
DNMT 3a	Terço basal	Núcleo	-/+	+	-/+
		Citoplasma	++	+	+/+++
	Terço médio	Núcleo	-	-/+	-
		Citoplasma	+	-	-
	Terço superior	Núcleo	-	-	-
		Citoplasma	+	-	-
DNMT 3b	Terço basal	Núcleo	+	+/+++	++/+++
		Citoplasma	-/+	-/+	-/+
	Terço médio	Núcleo	++	++/+++	++/+++
		Citoplasma	-	-	-
	Terço superior	Núcleo	++	++/+++	++/+++
		Citoplasma	-	-	-

FONTE: Dados da pesquisa

DESCRIÇÃO: MUC (mucocoele), QA (queilite actínica) e CEL (carcinoma epidermóide labial). - ausência de marcação, + marcação fraca, ++ marcação moderada, +++ marcação fortemente positiva.

Tabela 3 - Porcentagem de imunomarcção para as DNMTs nas lesões estudadas.

Enzima		MUC	QA	CCEL
DNMT 1	Núcleo	47,0% ($\pm 33,3\%$)	69,8% ($\pm 27,5\%$)	68,6% ($\pm 29,5\%$)
	Citoplasma	59,4% ($\pm 32,5\%$)	58,9% ($\pm 33,4\%$)	72,5% (30,8%)
DNMT 3a	Núcleo	4,4% ($\pm 5,2\%$)	35,9% ($\pm 31,3\%$)	8,8% ($\pm 22,9\%$)
	Citoplasma	16,1% ($\pm 12,1\%$)	35,5% ($\pm 26,9\%$)	13,2% ($\pm 16,3\%$)
DNMT 3b	Núcleo	37,9% ($\pm 34,2\%$)	44,0% ($\pm 29,0\%$)	70,9% ($\pm 29,4\%$)
	Citoplasma	9,1% ($\pm 8,7\%$)	7,2% ($\pm 7,3\%$)	7,9% ($\pm 8,5\%$)

FONTE: Dados da pesquisa

DESCRIÇÃO: MUC (mucosele), QA (queilite actínica) e CEL (carcinoma epidermóide labial). Média (\pm Desvio padrão)

Tabela 4 - Porcentagem de imunomarcção para as DNMTs de acordo com o grau de displasia epitelial nos casos de QA.

Enzima		DL (n10)	DM (n14)	DS (n6)
DNMT 1	Núcleo	69,0% ($\pm 18,9\%$)	72,9% ($\pm 31,3\%$)	64,0% ($\pm 33,6\%$)
	Citoplasma	62,6% ($\pm 34,5\%$)	59,0% ($\pm 33,8\%$)	52,4% ($\pm 35,8\%$)
DNMT 3a	Núcleo	29,0% ($\pm 27,5\%$)	36,1% ($\pm 32,7\%$)	46,7% ($\pm 39,0\%$)
	Citoplasma	29,2% ($\pm 20,1\%$)	39,3% ($\pm 31,2\%$)	37,2% ($\pm 30,9\%$)
DNMT 3b	Núcleo	41,2% ($\pm 24,8\%$)	47,0% ($\pm 28,3\%$)	41,7% ($\pm 40,6\%$)
	Citoplasma	4,9% ($\pm 4,7\%$)	9,7% ($\pm 8,8\%$)	5,1% ($\pm 5,5\%$)

FONTE: Dados da pesquisa

DESCRIÇÃO: DL: QA com displasia leve, DM: QA com displasia moderada, DS: QA com displasia severa, n: número de casos. Média (\pm Desvio padrão)

Tabela 5 - Porcentagem de imunomarcação para as DNMTs de acordo com a gradação histopatológica nos casos de CEL.

Enzima		BD (n12)	MD (n8)	PD (n10)
DNMT 1	Núcleo	66,2% ($\pm 25,3\%$)	87,0% ($\pm 31,8\%$)	62,7% ($\pm 33,5\%$)
	Citoplasma	89,9% ($\pm 22,6\%$)	84,7% ($\pm 32,5\%$)	72,0% ($\pm 37,8\%$)
DNMT 3a	Núcleo	18,6% ($\pm 33,1\%$)	10,4% (15,0%)	8,1% ($\pm 11,3\%$)
	Citoplasma	24,4% ($\pm 20,2\%$)	15,2% ($\pm 15,4\%$)	19,3% ($\pm 16,0\%$)
DNMT 3b	Núcleo	79,4% ($\pm 22,8\%$)	69,7% ($\pm 29,7\%$)	67,2% ($\pm 23,7\%$)
	Citoplasma	8,0% ($\pm 8,44\%$)	13,3% ($\pm 9,9\%$)	3,4% ($\pm 4,7\%$)

FONTE: Dados da pesquisa

DESCRIÇÃO: BD: CCEL bem diferenciado, MD: CCEL moderadamente diferenciado, PD: CEL pouco diferenciado, n: número de casos. Média (\pm Desvio padrão)

4.1 DNMT1

A observação morfológica da marcação para a DNMT1 no epitélio de revestimento das MUC mostrou um padrão de divisão deste tecido em terço basal, terço médio e terço superior. Na maioria dos casos estudados a marcação nuclear e citoplasmática foi intensa (+++) no terço basal, sendo que a marcação citoplasmática tornava-se moderada, fraca até negativa (++/+-) nos terços médio e superior, sem alteração na intensidade da marcação nuclear (Fig. 1A). No entanto, alguns casos exibiram núcleos negativos no terço basal (-).

Todos os casos de QA estudados exibiram marcação positiva para o anticorpo anti-DNMT1, havendo variação no padrão de distribuição e intensidade de marcação. A maioria dos casos apresentava positividade nuclear e citoplasmática de moderada a intensa (++/+++ no terço basal. Nos terços médio e superior os núcleos permaneciam com o mesmo padrão de expressão, porém o citoplasma passava a exibir marcação menos intensa ou até ausência de marcação (+/-) (Fig. 1B). Esse quadro foi observado principalmente nos casos classificados como displasia leve e moderada. No entanto, os casos de QA com displasia severa mantinham o citoplasma com positividade de moderada a intensa (++/+++ também nesses terços.

A expressão da DNMT1 nos CELs mostrou variação em distribuição e intensidade, principalmente quando se compara o terço basal com os terços médio e superior do epitélio neoplásico. Assim sendo, observou-se um padrão de distribuição predominante, onde as células presentes no terço basal apresentavam imunomarcação citoplasmática predominante

em quantidade de células e intensidade de marcação (++/+++) quando comparada a marcação nuclear, menos intensa e em menor número de células (-/+). Já nos terços médio e superior observa-se o aumento no número e na intensidade de células com núcleos marcados (++/+++), bem como a diminuição da intensidade e do número de citoplasmas positivos (-/+) (Fig. 1C). Nos casos em que o fragmento de tecido apresentava área de QA adjacente ao CEL, a imunomarcação presente na QA foi mais intensa que no CEL.

Quando compara-se os casos de CEL de acordo com o grau de diferenciação observamos que os casos de CELs bem diferenciados apresentavam imunomarcação citoplasmática forte (+++), principalmente no terço basal, que se atenuava conforme alcançava os terços médio e superior (+). Já a marcação nuclear manteve-se mais constante em intensidade, sendo moderada em todos os terços (++). No estudo dos CELs moderadamente diferenciados, observou-se predominância da marcação nuclear, sendo moderadamente positiva no terço basal e médio (++) e ausente no terço superior (-). A marcação citoplasmática, apesar de fortemente positiva no terço basal (+++), atenuou-se no terço médio (+) e inexistia no terço superior. Nos casos pouco diferenciados o terço basal exibiu marcação citoplasmática moderada (++) nuclear fraca ou negativa (+/-), terço médio e superior com ausência de marcação citoplasmática (-) e marcação nuclear moderada (++) .

Além disso, a enzima DNMT1 apresentou imunomarcação nuclear em 47% ($\pm 33,34\%$) das células epiteliais das MUC, 69,85% ($\pm 27,57\%$) das células das QA e 68,62% ($\pm 29,50\%$) das células dos CEL, com diferença estatisticamente significativa entre a MUC/CEL ($p < 0,05$ – Kruskal-Wallis). A imunomarcação citoplasmática esteve presente em 59,42% ($\pm 32,54\%$) das células das MUC, 58,93% ($\pm 33,45\%$) das células das QA e em 72,50% ($\pm 30,89\%$) das células dos CEL, sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,07$ – Kruskal Wallis). Não houve correlação entre a expressão da DNMT1 e o grau de displasia epitelial das QA ($p = 0,3$ – Kruskal Wallis) ou grau de diferenciação nos casos de CEL ($p = 0,4$ – Kruskal Wallis) .

4.2 DNMT3a

A imunomarcação para o anticorpo anti-DNMT3a no epitélio da mucosa de revestimento dos fragmentos de MUC foi, na maioria dos casos, citoplasmática e mais presente e intensa no terço basal (++) quando comparado com o terço médio e superior (+) (Fig. 1D). Aproximadamente 30% dos casos foram negativos.

No caso das QA, o terço basal exibiu marcação sempre mais intensa em relação aos demais terços. Mais especificamente, a maioria dos casos apresentou marcação fracamente positiva (+) em núcleo e citoplasma no terço basal e ausência de marcação nos outros terços (Fig. 1E). Na comparação entre marcação para a DNMT3a e o grau de displasia presente em cada QA, os resultados variaram. Nas displasias leves os núcleos e citoplasmas do terço basal foram fracamente positivos (+) e as células dos demais terços foram negativas. Na displasia moderada o mesmo padrão foi observado, no entanto uma quantidade significativa de casos exibiu também positividade nuclear fraca (+) no terço médio. Na displasia severa o terço basal apresentou núcleos e citoplasmas fracamente positivos (+) e o terço médio somente núcleos positivos (+), a semelhança de diversos casos de displasia moderada.

Aproximadamente 30% dos casos de CEL não exibiram imunomarcação para o anticorpo anti-DNMT3a. Nos casos positivos observou-se a maior presença e intensidade (+/++) de marcação no citoplasma das células do terço basal e alguns núcleos fracamente positivos (+) (Fig. 1F). Observou-se também uma tendência a ausência de marcação nas células que exibiam muito pleomorfismo. Nos casos de CEL que mostravam áreas de QA na periferia dos cortes, observou-se que havia um decréscimo da presença e intensidade de marcação na transição da QA para o CEL. No cruzamento do padrão de marcação com o grau de diferenciação das lesões, os resultados variaram. Metade dos casos de CEL bem diferenciados foi negativo e outra parte significativa dos casos apresentou um terço basal com citoplasmas fracamente positivos (+). Nos CELs moderadamente diferenciados a maioria dos casos exibiu o terço basal com citoplasma positivo (+/+). A maioria dos casos pouco diferenciados foi negativa e uma quantidade significativa apresentou marcação citoplasmática fraca (+) no terço basal.

Além disso, observou-se imunomarcação nuclear para a enzima DNMT3a em 4,49% ($\pm 5,28\%$) das células epiteliais das MUC, 35,9% ($\pm 31,3\%$) das células das QA e 8,84% ($\pm 22,92\%$) das células dos CEL, com diferença estatisticamente significativa entre a MUC/QA e entre QA/CEL ($p < 0,05$ – Kruskal-Wallis). A imunomarcação citoplasmática esteve presente em 16,19% ($\pm 12,18\%$) das células das MUC, 35,54% ($\pm 26,91\%$) das células das QA e em 13,29% ($\pm 16,39\%$) dos CEL, com diferença estatisticamente significativa entre MUC/QA e CEL/QA ($p < 0,05$ – Kruskal Wallis).

Ao se correlacionar a expressão desta enzima com o grau de displasia epitelial nas QAs e grau de diferenciação nos CELs, não se verificou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, no caso das QAs, pôde-se perceber que houve um nítido aumento na

sua expressão em função da maior gravidade da displasia epitelial (29,09% para displasia leve, 36,17% para displasia moderada e 46,79% para displasia severa). De forma inversa, no caso dos CELs observou-se uma redução da sua expressão em função do menor grau de diferenciação (16,31% para CELs bem diferenciados, 5,78% para aqueles moderadamente diferenciados e 0,91% para os pouco diferenciados).

4.3 DNMT3b

Parte significativa dos casos de MUC não exibiu marcação para o anticorpo anti-DNMT3b. Nos casos positivos, o padrão de marcação foi nuclear e variou em localização e intensidade de marcação, sendo que o terço basal do epitélio apresentava normalmente menor número de células e menor intensidade de marcação (+) quando comparado aos terços médio e superior (++) (Fig. 1G).

No caso das QA, a imunomarcação nuclear foi encontrada na maioria dos casos e somente 6 casos apresentaram marcação citoplasmática (concentrada em algumas células basais e com intensidade tênue (+)). O padrão da marcação nuclear variou pouco em distribuição e intensidade aparecendo normalmente em menor intensidade e número de células no terço basal (+/++) quando comparado aos terços médio e superior (++/+++) (Fig. 1H). Na comparação entre a imunomarcação da DNMT3b e o grau de displasia, as QAs com displasia leve e moderada exibiram marcação nuclear fraca ou moderada (+/++) e as displasias severas exibiram positividade forte (+++).

Nos espécimes de CEL estudados a marcação foi predominantemente nuclear estando presente na grande maioria das células e variando pouco em intensidade (++/+++) (Fig. 1I), com poucos casos exibindo marcação citoplasmática fraca (+). Não houve diferença na observação morfológica em relação ao grau de diferenciação entre os casos estudados.

Além disso, observou-se expressão nuclear em 37,91% ($\pm 34,27\%$) das células epiteliais das MUC, 44,07% ($\pm 29,04\%$) das células epiteliais das QA e 70,90% ($\pm 29,48\%$) das células neoplásicas dos CEL, com diferença estatisticamente significativa entre a MUC/CEL e entre QA/CEL ($p < 0,0001$ – Kruskal-Wallis). A imunomarcação citoplasmática esteve presente em 9,15% ($\pm 8,76\%$) das células das MUC, 7,23% ($\pm 7,3\%$) das células das QA e em 7,93% ($\pm 8,55\%$) dos CEL, sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,66$ – Kruskal

Wallis). Não houve correlação entre a expressão desta enzima com o grau de displasia epitelial das QA ou com grau de diferenciação nos casos de CEL.

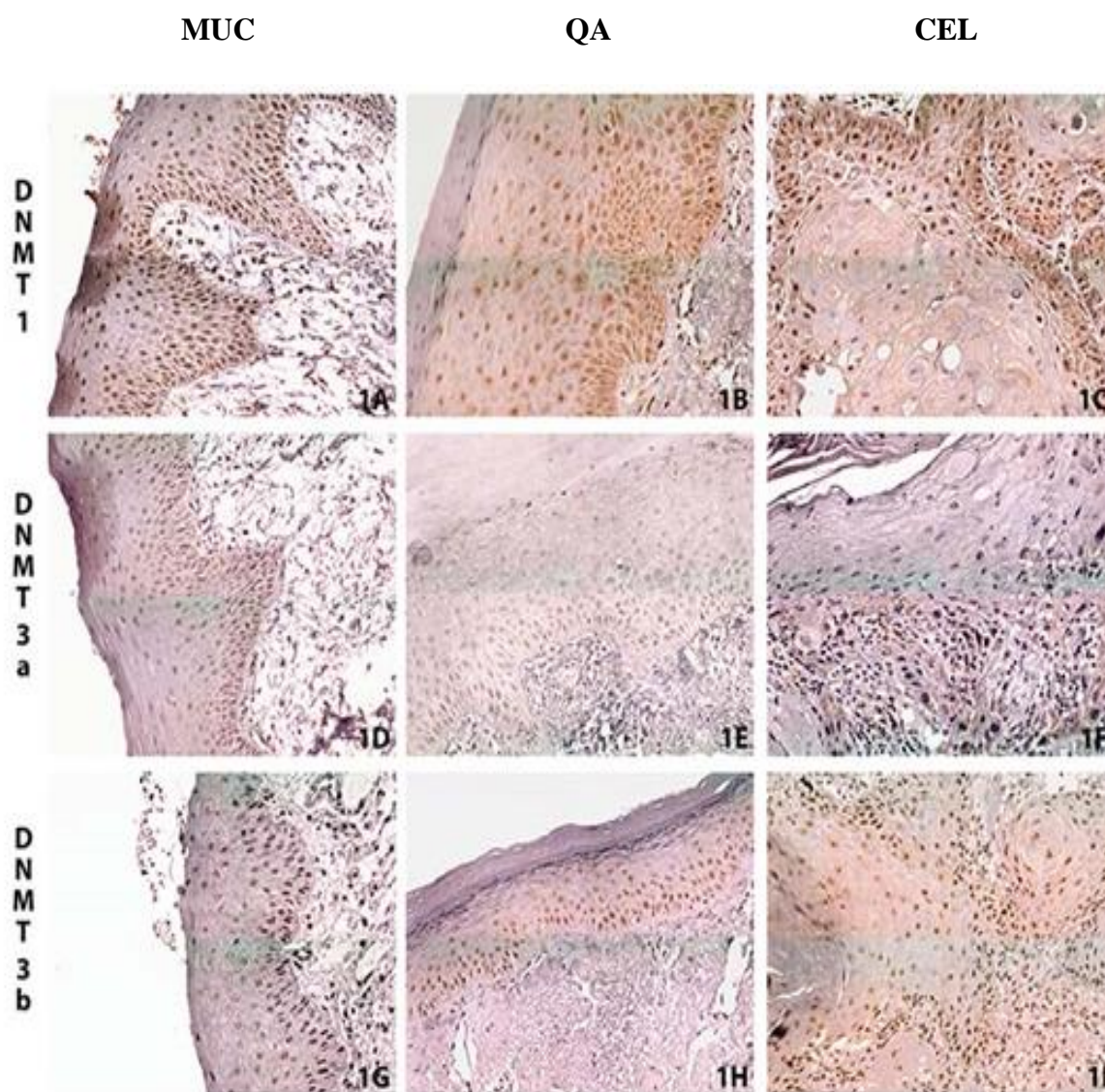


Figura 1: imunoexpressão das DNMTs em MUC, QA e CEL. Aumento de 400x. 1A a 1C imunoexpressão da DNMT1. 1D a 1F imunoexpressão da DNMT3a. 1G a 1I imunoexpressão da DNMT3b.

5 DISCUSSÃO

A oncogênese é resultado dos mecanismos de alterações genéticas e das alterações epigenéticas. As alterações epigenéticas modificam os padrões de expressão gênica sem afetar a sequência de DNA primário, envolvem tanto a perda quanto o ganho de metilação de DNA e podem iniciar a proliferação das células durante os estágios iniciais da transformação maligna. Embora tenham sido conhecidas mais recentemente, as alterações epigenéticas ocorrem com mais frequência do que as mutações, amplificações e translocações genéticas, nas quais ocorre mudança na sequência do DNA. Essas alterações epigenéticas podem persistir por toda a vida da célula e até mesmo por várias gerações (KYRGIDIS, TZELLOS e TRIARIDIS, 2010). A hipermetilação de genes resulta no seu silenciamento enquanto a hipometilação resulta no aumento da sua transcrição (EGGER *et al.*, 2004; BAYLIN E OHM, 2006; HA E CALIFANO, 2006).

A falha na regulação de qualquer um desses mecanismos leva à expressão inadequada de um gene, podendo resultar no desenvolvimento de cânceres e outras doenças, (FEINBERG E TYCKO, 2004; FEINBERG, OHLSSON E HENIKOFF, 2006), entre elas destacam-se os cânceres de pele e doenças auto-imunes. Dos cânceres de pele, os mais comuns são: carcinomas basocelulares, carcinoma epidermóide, melanoma e linfoma de pele; e das auto-imunes relacionadas com a pele são: psoríase, lúpus, dermatite atópica e vitiligo (LI, SAWALHA E LU, 2009). Além disso, as alterações epigenéticas levam ao aumento de risco de algumas doenças sistêmicas como: diabetes, obesidade e doenças cardíacas (DOLINOY, 2008; DUTHIE, 2011).

A hipermetilação é realizada pelas enzimas denominadas DNA metiltransferases (BAYLIN, 2002; JONES E BAYLIN, 2002; SAWADA *et al.*, 2007), e seu padrão de expressão já foi descrito anteriormente em outros processos de doença, principalmente os processos neoplásicos (ROBERTSON *et al.*, 1999; OGI *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2003; ARAI *et al.*, 2006; SAWADA *et al.*, 2007; DANIEL *et al.*, 2010). No entanto, esse é o primeiro trabalho que investiga o papel das DNMTs no processo de carcinogênese labial. Para isso foi estudada a expressão imuno-histoquímica das DNMTs 1, 3a e 3b em mucosa revestida por epitélio normal, sendo utilizada a mucocela (MUC), em queilites actínicas (QA) e carcinomas epidermóide de lábio (CEL).

Gronninger *et al.*, (2010), por meio do estudo da relação entre a exposição à radiação ultravioleta e a hipermetilação do DNA, demonstraram que quanto maior a exposição, maior a hipermetilação confirmando assim o importante papel da exposição crônica aos raios UV na metilação do DNA (GRÖNNIGER *et al.*, 2010).

A DNMT1 é a enzima responsável por manter o padrão de metilação após cada ciclo de replicação do DNA e, em células normais, é responsável pela manutenção do padrão preciso de metilação durante a mitose, portanto espera-se um aumento da sua expressão em tecidos em proliferação. Neste trabalho, quando observou-se a intensidade de imunomarcação, o terço basal apresentava significativa presença citoplasmática e nuclear da DNMT1, com decréscimo da intensidade de marcação citoplasmática nos terços médio e superior da QA e do CEL. Assim pode-se constatar que a DNMT1 está presente tanto no núcleo como no citoplasma das células do epitélio normal, porém quando este epitélio sofre as alterações pré-malignas e malignas, a expressão citoplasmática diminui em intensidade e passa a predominar a marcação nuclear, fato condizente com o local de ação dessa enzima durante a proliferação tecidual. Já na observação quantitativa do número de núcleos positivos para a DNMT1 observou-se diferença estatisticamente significativa na comparação entre MUC e o CEL, sendo a marcação nuclear sempre mais presente nos tecidos doentes quando comparados ao tecido normal. Essa predominância da imunoe expressão nuclear da DNMT1 nos tecidos pré-neoplásicos (QA) e neoplásicos (CEL) em comparação com tecido não-neoplásico pode ser explicada pelo fato de essas células doentes apresentarem uma taxa de proliferação aumentada, necessitando de maior quantidade de DNMT1, pois é justamente durante a duplicação do DNA que ela exerce sua função, mantendo o padrão de metilação do DNA da célula-mãe (JONES E BAYLIN, 2002). Além disso, a sobre-expressão da DNMT1 leva a um padrão de metilação descontrolado em genes supressores tumorais, fato que atrapalharia a sua função e, portanto facilitaria a progressão de processos neoplásicos (ZHU *et al.*, 2007).

O incremento da expressão da DNMT1 nestas amostras de tecidos doentes está de acordo com outros estudos (YANG *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013) que verificaram sobre-expressão de DNMT1 em tecidos neoplásicos de bexiga, cólon, rim, pâncreas, fígado, estômago e ovário, bem como Zhu *et al.*(2007) que encontraram maior número de células positivas em CE colo-retal, quando comparado com tecido normal.

As DNMT3a e DNMT3b estão envolvidas na adição de grupos metil ao DNA que não tenha sido previamente metilado, processo denominado de metilação *de novo* (BIRD, 1999;

ZHU *et al.*, 2007). No câncer, a sobre-expressão destas enzimas pode ser uma das principais responsáveis pela hipermetilação de genes supressores tumorais, conferindo às células uma importante vantagem ao perder o controle de sua proliferação (JONES E BAYLIN, 2002).

A sobre-expressão da DNMT3a já foi previamente relatada em tecidos neoplásicos de bexiga, colón, rim e pâncreas (ROBERTSON *et al.*, 1999), em tecido hepático neoplásico e pré-neoplásico (CHOI *et al.*, 2003) e em CE intra-oral (DANIEL *et al.*, 2010). Este trabalho demonstrou que há um pico de expressão da enzima DNMT3a na fase pré-neoplásica (QA) em comparação com o tecido normal (MUC) e com o tecido neoplásico (CEL). Além disso, observou-se um aumento progressivo de sua expressão em função da maior severidade da displasia epitelial (leve, moderada e severa) na QA e sua redução em função da menor diferenciação celular no CEL (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) sugerindo, mais especificamente, que este pico de expressão dessa proteína aconteça na transição da displasia severa para o carcinoma epidermóide bem diferenciado, ou seja, na fase exata de transformação maligna. Com base nestes resultados pode-se inferir que a enzima DNMT3a exerça um papel importante nas etapas iniciais da carcinogênese (fase pré-maligna), com ênfase na fase de transição entre doença pré-maligna e doença maligna, contribuindo através do silenciamento de genes supressores tumorais.

A DNMT3b mostrou uma tendência ao aumento de expressão nuclear conforme o aumento gravidade da doença estudada. Essa tendência foi observada tanto na análise do número de células positivas quanto na análise da intensidade de marcação. Esse padrão de expressão imuno-histoquímica é fortemente sugestivo do importante papel dessa enzima durante o processo de transição entre a ausência de malignidade (MUC), a pré-malignidade (QA) e a malignidade estabelecida (CEL). Além disso, a localização predominante dessa enzima no núcleo, com baixa expressão citoplasmática, leva a crer que a sua produção é imediatamente seguida de seu transporte para o núcleo, denotando seu rápido acesso ao DNA e instalação de um novo padrão de metilação do mesmo. A sobre-expressão da DNMT3b já havia sido relatada previamente em neoplasias de bexiga, cólon, rim e pâncreas (ROBERTSON *et al.*, 1999), porém não foi observada previamente em CE intra-orais (DANIEL *et al.*, 2010).

Nosso grupo de trabalho já havia investigado previamente a presença das enzimas DNMTs 1, 3a e 3b em CEs intra-orais (lesão maligna) e leucoplasias bucais (lesão potencialmente malignizável), e havia encontrado uma maior incidência da imunorreatividade nuclear para DNMT3a nos casos de CE bucal (39,9%), quando comparado ao epitélio normal

(22,6%) (DANIEL *et al.*, 2010). Quando correlacionamos os resultados obtidos neste projeto com os resultados obtidos em nosso estudo prévio, pudemos observar que as enzimas DNA metiltransferases estudadas parecem exercer um papel mais importante no caso da carcinogênese induzida pela radiação ultravioleta, também chamada de fotocarcinogênese, do que no caso da carcinogênese química induzida pelo tabaco, por isso, nos parece mais apropriado que os CEL sejam mais bem comparados aos CE de pele do que aos CE intra-orais. Neste contexto, Vahnharanta e Massagué (2012) sugerem que o silenciamento epigenético do gene Notch, um gene supressor tumoral, possa ser um possível mecanismo envolvido no desenvolvimento da ceratose actínica, o correspondente da QA em pele, e do CE de pele, ambas as doenças que tem como fator etiológico principal a exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta. Embora não tenhamos investigado o silenciamento de nenhum gene específico nos grupos estudados, pode-se inferir que o aumento da expressão das DNMTs estudadas nas células epiteliais labiais possa levar a um descontrole no padrão de metilação do DNA e assim contribuir para as alterações necessárias ao desenvolvimento do CEL (VANHARANTA E MASSAGUÉ, 2012).

Com os avanços sobre a epigenética do câncer, tem-se desenvolvido inibidores de DNA metiltransferases (DNMT), como: 5-azacitidina e decitabina, utilizadas para o tratamento de doenças malignas (GORE, 2005). O uso de inibidores epigenéticos junto com os agentes terapêuticos tradicionais anticâncer parece muito promissor como uma ferramenta para melhorar a sensibilidade do câncer (SUZUKI *et al.*, 2007). No entanto, a maioria destes agentes terapêuticos tem mostrado algumas desvantagens, sendo tóxicas. Porém a chance de compensar as alterações epigenéticas orientadas em células de câncer abre um promissor futuro possível para os cuidados com o CE de boca (MASCOLO *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo:

- A enzima DNMT1 apresentou maior imunorreatividade nuclear nos casos de QA e de CEL, quando comparado com a MUC;
- A enzima DNMT3a mostrou maior imunorreatividade nuclear e citoplasmática nos casos de QA comparado a MUC e CEL;
- A enzima DNMT3b apresentou maior imunorreatividade nuclear nos casos de CEL quando comparado com a MUC e QA;
- Não houve correlação da expressão imuno-histoquímica das enzimas com o grau de displasia epitelial nas QA e com a diferenciação histopatológica nos CEL.

Dessa forma pode-se concluir que: o aumento da expressão destas enzimas pode estar relacionado com a carcinogênese labial induzida pela radiação solar, seja na sua fase pré-maligna de QA (DNMT1 e DNMT3a) ou no CEL já instalado (DNMT1 e DNMT3b). Sendo assim, estas enzimas deverão ser alvo de futuros estudos por nosso grupo objetivando confirmar estes resultados por meio de metodologias mais acuradas como PCR quantitativo.

REFERÊNCIAS

ARAI, E. et al. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase(DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. **Int J Cancer**, v. 119, n. 2, p. 288-96, Jul 15 2006. ISSN0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453286> >.

BARNES, L., EVERSON, J.W., REICHART, P., SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. 327.

BAYLIN, S. B. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. **Semin Cancer Biol**, London, v. 12, n. 5, p. 331-7, Oct 2002. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12191632 >.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, London, v. 6, n. 2, p. 107-16, Feb 2006. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16491070 >.

BERNER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

BIRD, A. DNA methylation de novo. **Science**, Washington, v. 286, n. 5448, p. 2287-8, Dec 17 1999. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10636791 >.

BRASIL, M. D. S. Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp> >.

CHOI, M. S. et al. Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 34, n. 1, p. 11-7, Jan 2003. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12605361 >.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1231

CURY, P. R. et al. Signal transducer and activator of transcription-3 expression and activation is dysregulated in actinic cheilitis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 34, n. 8, p. 606-611, 2007. ISSN 1600-0560. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00668.x> >.

DAHER, G. C. D. A.; PEREIRA, G. A.; OLIVEIRA, A. C. D. Características epidemiológicas de casos de câncer de boca registrados em hospital de Uberaba no período 1999-2003: um alerta para a necessidade de diagnóstico precoce. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 4, p. 584-596, 2008.

DANIEL, F. I. et al. Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 12, p. 1024-30, Dec 2010. ISSN 1879-1506 (Electronic) 0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951977> >.

DEDIVITIS, R. A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira d Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 35-40, 2004. ISSN 0034-7299. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003472992004000100006&nrm=i so >.

DOLINOY, D. C. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. **Nutr Rev**, v. 66 Suppl 1, p. S7-11, Aug 2008. ISSN 1753-4887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18673496> >.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 4, p. 237-241, 2003. ISSN 1600-0560. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.0303-6987.2002.028.x> >.

DUTHIE, S. J. Epigenetic modifications and human pathologies: cancer and CVD. **Proc Nutr Soc**, v. 70, n. 1, p. 47-56, Feb 2011. ISSN 1475-2719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067630> >.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, London, v. 429, n. 6990, p. 457-63, May 27 2004. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15164071 >.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 1, p. 21-33, Jan 2006. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369569> >.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-53, Feb 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732866> >.

GAO, J. et al. Aberrant DNA methyltransferase expression in pancreatic ductal adenocarcinoma development and progression. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 32, n. 1, p. 86, 2013. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423239> >.

GORE, S. D. Combination therapy with DNA methyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1, p. S30-5, Dec 2005. ISSN 1743-4254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341238> >.

GRÖNNIGER, E. et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000971, May 2010. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523906> >.

HA, P. K.; CALIFANO, J. A. Promoter methylation and inactivation of tumoursuppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol**, London, v. 7, n. 1, p. 77-82, Jan 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16389187>.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, London, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12042769>.

JONES, P. A.; LIANG, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 11, p. 805-11, Nov 2009. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789556> >.

KORNEVS, E. et al. 5 year experience with lower lip cancer. **Stomatologija**, v. 7, n. 3, p. 95-8, 2005. ISSN 1392-8589. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340275>>.

KYRGIDIS, A.; TZELLOS, T. G.; TRIARIDIS, S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **J**

Carcinog, v. 9, p. 3, 2010. ISSN 1477-3163. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442802> >.

LEE, J. Y. et al. Hypermethylation and post-transcriptional regulation of DNA methyltransferases in the ovarian carcinomas of the laying hen. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61658, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613894> >.

LI, Y.; SAWALHA, A. H.; LU, Q. Aberrant DNA methylation in skin diseases. **J Dermatol Sci**, v. 54, n. 3, p. 143-9, Jun 2009. ISSN 1873-569X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19395242> >.

LIN, M. H. et al. Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 9, p. 907-13, Oct 2006. ISSN 1368-8375. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730219> >.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5. São Paulo: Artmed, 2005.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212- 216, 2004. ISSN 1601-0825. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01004.x> >.

MARTÍNEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n. 5, p.257-262, 2005. ISSN 1600-0714. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00299.x> >.

MASCOLO, M. et al. Epigenetic disregulation in oral cancer. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 2, p. 2331-53, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22408457> >.

MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian J Cancer**, v. 43, n. 2, p. 60-6, Apr-Jun 2006. Disponível em:
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16790942 >.

MIRANDA, T. B.; JONES, P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 2, p. 384-90, Nov 2007. ISSN 0021-9541. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708532> >.

NANDAKUMAR, V. et al. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 4, p. 597-604, Apr 2011. ISSN 1460-2180. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186298>>.

OGI, K. et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 8, n. 10, p. 3164-71, Oct 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12374684>.

OUHTIT, A. et al. Temporal Events in Skin Injury and the Early Adaptive Responses in Ultraviolet-Irradiated Mouse Skin. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 1, p. 201-207, 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010647207>>.

PARISE, O. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier, 2000. 256

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia Oral: Correlações clínicopatológicas**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 420

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12764019>.

ROBERTSON, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 11, p. 2291-8, Jun 1 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10325416>.

SAWADA, M. et al. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 211-9, Jun 28 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17196739>.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93- 102, 2010.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de Medicina Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 384

SUZUKI, M. et al. Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 31, n. 6, p. 1449-56, Dec 2007. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982671> >.

TEIXEIRA, A. K. M. et al. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 229-236, 2009.

VANHARANTA, S.; MASSAGUÉ, J. Field cancerization: something new under the sun. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1179-81, Jun 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682238> >.

YANG, J. et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Mol Med Rep**, v. 4, n. 6, p. 1139-43, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887466> >.

ZHU, Y. M. et al. Expression of human DNA methyltransferase 1 in colorectal cancer tissues and their corresponding distant normal tissues. **Int J Colorectal Dis**, Heidelberg, v. 22, n. 6, p. 661-6, Jun 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17093909 >.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2274

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2274 **FR:** 465903

TÍTULO: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS DNMT1, DNMT3a E DNMT3b EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS LABIAIS

AUTOR: Filipe Modolo Siqueira, Filipe Ivan Daniel

FLORIANÓPOLIS, 31 de Outubro de 2011.

Coordenador do CEPSH/UFSC

